

临床研究

黄芪多糖干预树突状细胞基因表达与抗动脉粥样硬化的机制

陈朝俊¹, 傅强², 李玥珺¹, 李志樑²¹广州市中西医结合医院脑病科, 广东 广州 510800; ²南方医科大学附属珠江医院心内科, 广东 广州 510282

摘要:目的 研究黄芪多糖(APS)对外周血单核细胞(PBMC)源性树突状细胞(DCs)的基因表达和其功能变化的影响,进一步探讨黄芪多糖的抗AS的作用机制。方法 以健康人外周血分离PBMC源性DCs和血清作为研究对象,培育5 d后,随机分为APS组 and 对照组。其中APS组给予200 mg/L APS孵育过夜,对照组不给干预。通过基因芯片和RT-PCR技术,观察APS处理PBMC源性DCs的免疫功能和其他基因表达的差异与AS发生发展的关系。结果 与对照组相比,APS组 CD36(0.97 ± 0.23 vs 5.45 ± 1.14)、IL-27(1.08 ± 0.22 vs 2.97 ± 0.61)基因表达相对量显著性上调;APS组 IFI16(0.98 ± 0.18 vs 0.46 ± 0.11)基因表达相对量显著性下调。结论 适量的APS可以上调DCs膜表面与抗原递呈相关的CD36、IL-27的表达,下调IFI16的表达,对增加DCs的免疫活性,促进DCs的成熟与分化有显著的影响。APS对AS的发生发展具有明显的积极地干预作用,有着重要的积极地临床意义。

关键词: 黄芪多糖;树突状细胞;基因表达;CD36;IL27;IFI16

Effect of *Astragalus mongholicus* polysaccharides on gene expression profiles of dendritic cells isolated from healthy donorsCHEN Chaojun¹, FU Qiang², LI Yuejun¹, LI Zhiliang²¹Department of Neurology, Guangzhou Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Guangzhou 510800, China; ²Department of Cardiology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To investigate the anti-atherosclerosis mechanism of *Astragalus mongholicus* polysaccharides (APS) by examining its effect on gene expression profiles of the dendritic cells (DCs) from healthy donors. **Methods** Peripheral blood DCs from healthy donors were incubated with 200 mg/L APS overnight, and changes in the gene expression profiles were investigated using microarray technique and RT-PCR. **Result** Compared with the control cells, APS-treated DCs showed significantly up-regulated expressions of CD36 (0.97 ± 0.23 vs 5.45 ± 1.14) and IL-27 (1.08 ± 0.22 vs 2.97 ± 0.61) and down-regulated expression of expression of IFI16 (0.98 ± 0.18 vs 0.46 ± 0.11). **Conclusion** APS can promote the maturation and differentiation of DCs by up-regulating CD36 and IL-27 and down-regulating IFI16, and thus positively affects the occurrence and progression of the atherosclerosis.

Key words: *Astragalus mongholicus* polysaccharides; dendritic cells; gene expression; CD36; IL27; IFI16

树突状细胞(DCs)是机体免疫系统中最强的抗原递呈细胞,具有强大的抗原提呈及激活原始T淋巴细胞的能力^[1-2],愈来愈多的研究表明炎症反应是导致斑块不稳定的重要原因^[3],近来对树突状细胞在动脉粥样硬化(AS)的发生、发展中所起的作用越发受到关注^[4-7]。黄芪是心脑血管疾病常用的补气类中药,临床疗效十分显著,尤其在冠心病心绞痛的治疗中,黄芪注射液能明显减少心绞痛的发作次数,延长发作间歇时间,临床疗效改善显著^[8-9]。同时,黄芪还是治疗卒中经典名方“补阳还五汤”的君药(主药),其临床疗效与黄芪剂量呈量效关系。可见黄芪对心脑血管病的防治有着十分重要的作用。且为纯天然药物,对其作用机制进行深入的研究有着十分重要的意义。

黄芪有效成分提取物为黄芪多糖(APS)。现代研究认为APS具有提高免疫细胞活性^[10]、促进淋巴细胞转化及抗体形成等双向调节功能^[11],在多种疾病中发挥重要作用。以往的研究证实,黄芪多糖可以促进DCs的分化与成熟,增加其免疫活性^[12],提示APS可能通过调节DCs的功能状态而对动脉粥样硬化的发生及发展产生影响^[12-13]。DCs的功能状态改变是一系列基因表达变化的反映^[14],因此,要研究黄芪多糖对树突状细胞功能变化的影响,最终明确黄芪多糖在动脉粥样硬化斑块治疗中所起的作用,必须从研究树突状细胞的相关基因入手。研究APS对DCs基因表达的差异性变化,将有利于对APS免疫调节功能变化的进一步剖析。本课题拟研究黄芪多糖对外周血单核细胞源性树突状细胞的基因表达和其功能变化的影响,进一步探讨黄芪多糖的

收稿日期:2015-09-23

作者简介:陈朝俊,博士研究生,主任医师,E-mail: cgzccj@163.com

通信作者:李志樑,主任医师,E-mail: lizhouxiaoyu@163.com

抗AS的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验对象

南方医科大学健康男性学生(24~26岁)外周血标本。

1.2 血液标本采集和PBMC的分离

清晨空腹抽取动脉血 20 mL,用Ficoll密度梯度离心法分离PBMC。

1.3 DCs的培养

末次离心重悬的PBMC加入 25 mL培养瓶中,调整细胞浓度 $1\times 10^8\sim 1.5\times 10^8/\text{mL}$ 之间,5% CO_2 37.5 $^\circ\text{C}$ 孵育 2~3 h后,轻轻吸出悬浮细胞,应用PBS溶液 2~3 mL轻轻清洗 1次培养瓶后吸出,吸出的悬浮细胞用于PBTC的纯化;在培养瓶重新加入终浓度为GM-CSF 20 ng/mL,IL-4 20 ng/mL的DCgro无血清培养基 4 mL,继续于 5% CO_2 37.5 $^\circ\text{C}$ 培养 3~5 d。在培养 3~4 d,观察贴壁细胞的生长及悬浮情况,观察到培养第 5天,大部分贴壁细胞基本悬浮生长后,第 5天随机分为APS组及对照组,APS组加入黄芪多糖(200 mg/L)并孵育过夜,对照组不给予任何干预措施。第 6天收集DCs应用于Real-time PCR检测。

1.4 基因芯片技术检测基因谱变化

①制备RNA;②鉴定总RNA样品质量;③荧光标记RNA样品;④cDNA标记样品的纯化;⑤OHS-460基因芯片杂交;采用上海康成生物有限公司生产的原位合成试剂盒、OHS-460寡核苷酸基因芯片试剂盒进行样品的准备和杂交。表达差异的基因按照功能进行归类,查阅GenBank数据库及相关文献对其结果进行深入的分析及讨论。

1.5 实时定量PCR

1.5.1 引物(表1)

1.5.2 目的基因mRNA表达量的相对定量 以APS组和对照组DCs细胞总RNA为模板,使用 2 Step Real-time PCR方法,进行基因CD36、IL27及IFI16的RT-PCR反应,将得到的Ct值在目的基因的标准曲线上进行不同样品的目的基因的表达量定量。用定量结果除以相对值,对反应起始RNA量的误差进行校正。通过校正后的定量结果,求出样品之间的目的基因的表达量相对值,即mRNA表达量的相对定量。

1.5.3 实验结果分析 反应结束后,根据内标GAPDH和目的基因(CD36、IL27及IFI16)的一系列扩增曲线得到的Ct值制作各自的标准曲线,对检测样品目的基因mRNA进行相对定量。

1.5.4 统计学处理 所有实验结果以均数±标准差表示,计数资料用 χ^2 检验,两组间差异比较采用t检验,以 $P<$

表1 荧光定量PCR引物序列

Tab.1 Sequences of RT-PCR primers

Number	Target gene	Sequences(5'-3')	Length of amplified gene (bp)
1	IL-27	AGGACCATCGGAATCTTG GCACTTGACAATCATGTAACC	120
2	CD36	TACTTTCTTCCTTTCCAGC CCGACTTTTGTTCATAT	129
3	IFI16	ATGCTACTTCACCTGCA CCTCGGACACCTTACTC	132
4	GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC ATGGTGGTGAAGACGCCAGT	142

0.05认为有显著性差异。所有统计学处理均采用SPSS 17.0统计软件进行分析。

2 实验结果

2.1 基因芯片检测结果

使用Agilent 2100生物分析仪鉴定APS组和正常对照组样品的总RNA质量,分别测定 28 s/18 s峰值的面积比值、A260/A280的Ratio值、质量浓度,鉴定结果显示结果表明两样品总RNA 28 s/18 s峰值的面积比值都在 2:1左右,RNA的质量符合基因芯片测定的要求。图 2为标记样品与芯片杂交后的扫描结果,通过分析APS处理后DCs及对照组芯片杂交的结果,在检测的 288个探针中,共筛出差异表达基因 33个,其中CD36、IL27基因表达上调,IFI16基因表达下调。

A显示APS处理后DCs基因表达谱,B显示正常对照组DCs基因表达谱。荧光强度显示基因表达强度,荧光强度高表明基因表达增强,反之表达减弱。无荧光表明不表达。

2.2 Real-time PCR结果

从内标GAPDH基因和 3个目的基因的扩增曲线和标准曲线结果中,可见所有标准曲线的线性关系良好,在实验浓度范围内能够进行准确定量。

2.2.1 相对定量

2.2.2 APS组与对照组的外周血PBMC来源的DCs基因表达差异情况 将所有外周血PBMC来源的DCs提取的cDNA样本分别与标准品中目的基因的表达相对定量的结果比较,APS组患者CD36、IL-27和IFI16基因表达相对量分别为 5.45 ± 1.14 、 2.97 ± 0.61 、 0.46 ± 0.11 ;而对照组病例表达量分别为 0.97 ± 0.23 、 1.08 ± 0.22 、 0.98 ± 0.18 ;APS组患者CD36、IL-27和IFI16等基因的表达与对照组相比差异有显著性意义,说明APS组DCs的CD36、IL-27和IFI16的基因表达量较对照组升高(表3)。

chinaXiv:201712.00688v1

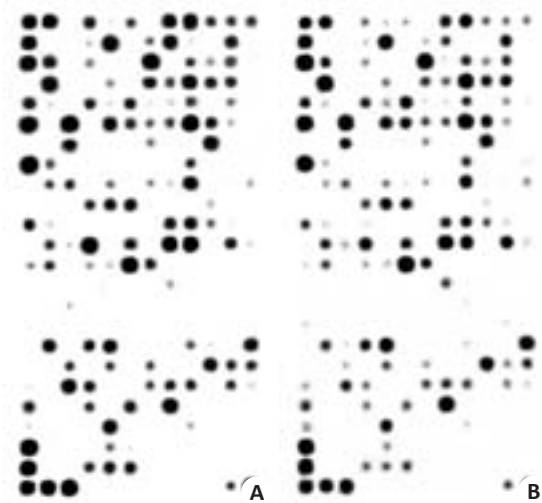


图1 OHS-460芯片的杂交结果
Fig.1 Result of OHS-460 chip hybridization. A: Gene expression of DCs in APS group; B: Control group.

表2 CD36基因的相对定量结果
Tab.2 Quantitative result of CD36 gene expression

	GAPDH		CD36		Relative value of CD36
	Quantitative result	Relative value (X)	Quantitative result (Y)	Corrected quantitative result (Y/X)	
Sample A	438.0	0.899	666.00	740.82	5.92
Sample B	487.0	1	125.20	125.20	1

表3 APS组与对照组PBMC来源的DCs基因表达差异情况
Tab.3 Differentially expressed genes in DCs treated with APS

	ACS(n=7)	Control(n=7)	t	P
CD36	5.45±1.14	0.97±0.23	10.19	<0.001
IL-27	2.97±0.61	1.08±0.22	7.711	<0.001
IFI16	0.46±0.11	0.98±0.18	6.522	<0.001

细胞因子蛋白的表达增多;而与细胞粘附、增殖、抗原提呈及诱导免疫反应相关的蛋白表达明显降低。可见APS可以诱导DCs功能基因的表达,既可促进高表达成熟细胞因子的作用,也有诱导未成熟及抑制炎症的作用。APS的这种诱导作用使DCs的基因表达产生差异,可能导致不同亚群和不同成熟状态的DCs之间发生转化,继而影响DCs最后的功能状态。未成熟的树突状细胞抗原识别能力高,摄取和降解抗原能力强;而成熟的树突状细胞其抗原提呈能力增强,抗原识别和摄取功能下降。相应的见文献[15]。我们的研究表明,黄芪多糖可调节人外周血单个核细胞来源的树突状细胞的基因表达,可使IFI16表达下降。IFI16可诱导树突状细胞抗原呈递能力增强,诱导免疫反应^[16]。同时,黄芪多糖可使CD36及IL27的表达升高。CD36可促使抗原结合^[17],而IL27可抑制炎症及免疫反应,促进免疫耐受的

3 讨论

本研究观察了黄芪多糖对人外周血单个核细胞来源的DCs作用,发现黄芪多糖具有调节DCs基因表达的作用,影响树突状细胞基因向抑制炎症反应、控制免疫反应的方向表达。基因芯片结果显示,APS处理后人外周DCs功能蛋白表达基因中抗原结合蛋白基因CD36、抑制炎症及免疫反应的蛋白IL27表达明显上升,而与抗原提呈及诱导免疫反应相关的蛋白基因IFI16表达明显下降。APS处理后人外周血DCs功能蛋白表达基因结果亦支持基因芯片结果,CD36、IL27表达明显上升,而IFI16表达明显下降。从本研究我们可以发现,经黄芪多糖处理后DCs与对照组DCs相比较,APS处理后的DCs基因表达表现出更多的差异,表现为有关抗原结合、降解、加工以及抑制炎症的细胞功能及

发生^[18]。现有的研究表明,树突状细胞作为抗原提呈的专职细胞,对T淋巴细胞的调节作用是双向的。树突状细胞既可活化T淋巴细胞,激活Th1细胞免疫;又可调节人体免疫系统,增强机体免疫耐受^[19]。

本研究结果显示,黄芪多糖对人外周血单核细胞来源的树突状细胞具有双向调节作用,抑制炎症反应的细胞因子蛋白的表达增多,诱导免疫反应相关的蛋白表达明显降低。可见黄芪多糖对树突状细胞功能基因表达的诱导作用,既有促进高表达成熟细胞因子的作用,也有诱导未成熟及抑制炎症的作用。

综上所述,树突状细胞的成熟状态对免疫系统具有不同的调节作用,而黄芪多糖处理的外周血单核细胞来源的树突状细胞基因表达向着抑制炎症反应,提高免疫耐受的方向发展。试验的结果发现黄芪多糖处理组树突状细胞与对照的基因表达出现差异,CD36、IL27的表达升高而IFI16的表达减少,这些基因的表达变化与DCs的成熟状态及功能变化高度相关。APS抑制DCs对免疫系统的活化,达到抑制炎症,稳定斑块的作用^[20-21]。黄芪多糖处理的外周血单核细胞来源的树突状细胞基因表达为抑制炎症反应,提高免疫耐受的特性。而炎症在AS的发生发展中起到关键作用,APS通过调节树突状细胞起到免疫抑制作用,提示APS对AS的发生发展具

有明显的干预作用,有着积极地临床意义。在现有的中药治疗心脑血管疾病的方法中,黄芪在冠心病上的治疗作用非常显著,但作用机制尚未明确。我们为其抗动脉粥样硬化作用与机制的研究提供了新的研究思路,并为今后应用纯天然药物黄芪提取物黄芪多糖参与树突状细胞防治动脉粥样硬化的临床研究提供了可靠的实验依据。

参考文献:

- [1] Manicassamy S, Pulendran B. Dendritic cell control of tolerogenic responses[J]. *Immunol Rev*, 2011, 241(1): 206-27.
- [2] Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets[J]. *Immunity*, 2014, 40(5): 642-56.
- [3] Kablak-Ziembicka A, Przewlocki T, Sokołowski A, et al. Carotid intima-media thickness, hs-CRP and TNF- α are independently associated with cardiovascular event risk in patients with atherosclerotic occlusive disease[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214(1): 185-90.
- [4] Koltsova EK, Ley K. How dendritic cells shape atherosclerosis[J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(11): 540-7.
- [5] Paulson KE, Zhu SN, Chen M, et al. Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2010, 106(2): 383-90.
- [6] Van Vré EA, Van Brussel I, Bosmans JM, et al. Dendritic cells in human atherosclerosis: from circulation to atherosclerotic plaques[J]. *Mediators Inflamm*, 2011, (8): 941396.
- [7] Yang L, Du CQ, Chen T, et al. Distinct MAPK pathways are involved in IL-23 production in dendritic cells cocultured with NK cells in the absence or presence of angiotensin II[J]. *Mol Immunol*, 2012, 51(1): 51-6.
- [8] 王海燕. 黄芪治疗冠心病心绞痛临床分析[J]. *亚太传统医药*, 2014, 17(17): 109-10.
- [9] 陈冰, 李志樑, 靳文, 等. 慢性心力衰竭患者外周血白介素-27与树突状细胞亚群变化的研究[J]. *中国实用内科杂志*, 2014, 9(9): 888-91.
- [10] 刘印华, 赵志强, 李树义, 等. 黄芪多糖对免疫功能影响的体内实验研究[J]. *河北医药*, 2015, 4(4): 485-7.
- [11] Hochweller K, Sweenie CH, Anderton SM. Immunological tolerance using synthetic peptides--basic mechanisms and clinical application[J]. *Curr Mol Med*, 2006, 6(6): 631-43.
- [12] 荆雪宁, 邱波, 王金凤, 等. 黄芪多糖诱导成熟的树突状细胞肿瘤疫苗体外抗肿瘤作用的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 9(9): 1103-7.
- [13] 陈朝俊, 李志梁, 傅强, 等. 黄芪多糖应用于人外周血源性树突状细胞体外培养的实验研究[J]. *南方医科大学学报*, 2009, 6(6): 1192-4.
- [14] Fridman WH, Remark R, Goc J, et al. The immune microenvironment: a major player in human cancers[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2014, 164(1): 13-26.
- [15] Mohammadi A, Mehrzad J, Mahmoudi M, et al. Effect of culture and maturation on human monocyte-derived dendritic cell surface markers, necrosis and antigen binding[J]. *Biotech Histochem*, 2015, 90(6): 445-52.
- [16] Unterholzner L, Keating SE, Baran M, et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(11): 997-1004.
- [17] 靳文, 李志樑, 傅强. 氧化低密度脂蛋白对树突状细胞表面CD36表达的影响[J]. *现代医院*, 2013, 8(8): 28-30.
- [18] Wei J, Xia S, Sun H, et al. Critical role of dendritic cell-derived IL-27 in antitumor immunity through regulating the recruitment and activation of NK and NKT cells[J]. *J Immunol*, 2013, 191(1): 500-8.
- [19] Ikeda T, Hirata S, Takamatsu K, et al. Suppression of Th1-mediated autoimmunity by embryonic stem cell-derived dendritic cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115198.
- [20] Packard RR, Maganto-García E, Gotsman I, et al. CD11c(+) dendritic cells maintain antigen processing, presentation capabilities, and CD4(+) T-cell priming efficacy under hypercholesterolemic conditions associated with atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2008, 103(9): 965-73.
- [21] Daissormont IT, Christ A, Temmerman L, et al. Plasmacytoid dendritic cells protect against atherosclerosis by tuning T-cell proliferation and activity[J]. *Circ Res*, 2011, 109(12): 1387-95.

(编辑:孙昌朋)